การใช้สารสกัดอัลลิโลพาธิคจากหญ้าโขย่งในการควบคุมการเจริญเติบโตของสาบแร้งสาบกา และผักกาดหอม

Application of Allelopathic Extracts from Itchgrass(*Rottboellia cochinchinensis*) for Growth Control of *Ageratum conyzoides* and *Lactuca sativa*

อภิรัฐ บัณฑิต[1] วันเพ็ญ เหล่าศรีไพบูลย์[2] และ ทศพล พรพรหม[1*]

Apirat Bundit[1], Wanpen Laosripaiboon[2] and Tosapon Pornprom[1*]

Abstract

Itchgrass (*Rottboellia cochinchinensis* (Lour.) W.D. Clayton) is an annual upland weed that is widely distributed in maize and sugarcane plantation. It has a strong competitive ability and possible allelopathic activity to other plant species. Farmers in Chaehom-Lampang, northern Thailand, have been cultivating itchgrass and using it as a mulching material for weed control in the vegetable fields. Cultivated itchgrass decreases the weed density in the vegetable fields and is supposed to release the allelochemicals. At present, the potential allelopathy crude extract from itchgrass on seedling growth of test plant species was investigated. The results showed that the crude extract from itchgrass was potentially reduced the shoot and root length of *Ageratum conyzoides* L. and *Lactuca sativa* L. var. OP. In addition, the purification of allelochemical from itchgrass showed that the using of partitioning and column chromatography techniques for purification of an active fraction from itchgrass crude extract. The bioassay test was showed that the active fraction was inhibitory the growth of *Ageratum conyzoides* L. and *Lactuca sativa* L. var. OP. These results indicated that itchgrass had created and released the allelochemicals that inhibited the growth of adjacent plants, thus itchgrass had allelopathy potential for weed control.

Keyword: allelochemicals, bioassay test, extraction, itchgrass, purification

[1] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen campus, Nakhon Pathom.

[2] สาขาวิชาเคมี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม

Department of Science, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen campus, Nakhon Pathom.

รับเรื่อง : พฤษภาคม 2556

[*] Corresponding author: agrtpp@ku.ac.th.

บทคัดย่อ

หญ้าโขย่ง เป็นวัชพืชอายุฤดูเดียว ชอบขึ้นในที่ดอน เป็นปัญหาในไร่ข้าวโพด และอ้อย มีความสามารถในการแข่งขันสูง และมีศักยภาพทางอัลลิโลพาธีกับพืชชนิดอื่นที่อยู่ข้างเคียง ซึ่งเกษตรกรในพื้นที่ อ. แจ้ห่ม จ. ลำปาง ได้นำหญ้าโขย่งมาใช้ในลักษณะของวัสดุคลุมแปลงสำหรับควบคุมวัชพืชภายในแปลงปลูกพืชผัก ส่งผลทำให้จำนวนประชากรของวัชพืชลดลง และเชื่อว่าหญ้าโขย่งมีการปลดปล่อยสารอัลลิโลพาธิค การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาศักยภาพทางอัลลิโลพาธีของสารสกัดหยาบหญ้าโขย่งที่มีผลต่อการเติบโตของต้นอ่อนพืชทดสอบ พบว่า สารสกัดหยาบหญ้าโขย่งส่งผลยับยั้งความยาวส่วนเหนือดิน และความยาวส่วนราก ของพืชทดสอบสาบแร้งสาบกา และผักกาดหอม พันธุ์ OP นอกจากนี้ เมื่อทำการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของสารอัลลิโลพาธิคจากหญ้าโขย่ง พบว่า การใช้วิธีการสกัดแบบแบ่งส่วนและคอลัมน์โครมาโทกราฟี สามารถแยกสารออกฤทธิ์จากหญ้าโขย่งให้บริสุทธิ์ได้ เมื่อนำสารออกฤทธิ์ไปทำการทดสอบทางชีววิธี พบว่า สารออกฤทธิ์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบหญ้าโขย่งส่งผลยับยั้งการเติบโตของพืชทดสอบสาบแร้งสาบกา และผักกาดหอม พันธุ์ OP อย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่า หญ้าโขย่งมีการสร้างสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารอัลลิโลพาธิคและปลดปล่อยสารออกมา ซึ่งจะไปมีผลในการยับยั้งการเติบโตของพืชชนิดอื่นที่อยู่ข้างเคียง ดังนั้นหญ้าโขย่งจึงมีศักยภาพทางอัลลิโลพาธีในการควบคุมวัชพืช

คำนำ

ในปัจจุบันนี้การใช้สารป้องกันกำจัดวัชพืชในระบบการปลูกพืช มีการใช้อย่างต่อเนื่องและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ในปี พ.ศ. 2555 ประเทศไทยได้มีการนำเข้าของสารป้องกันกำจัดวัชพืช 91,114.60 ตัน คิดเป็นมูลค่า 10,913.63 ล้านบาท (Office of Agricultural Regulation, 2012) อย่างไรก็ตาม การใช้สารอย่างต่อเนื่องและเพิ่มปริมาณมากขึ้น อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนของสารพิษตกค้างในผลผลิตทางการเกษตรและสิ่งแวดล้อม ซึ่งการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับศักยภาพทางอัลลิโลพาธี สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมวัชพืชได้ ทั้งทางตรงในลักษณะของวัสดุจากพืช หรือรูปแบบของสารสกัด และทางอ้อมโดยการนำโครงสร้างทางเคมีของสารอัลลิโลพาธิคไปใช้ในการพัฒนาเป็นสารป้องกันกำจัดวัชพืชต้นแบบจากธรรมชาติต่อไป (Scognamiglioe *et al.*, 2013) ซึ่งได้มีรายงานการใช้ศักยภาพทางอัลลิโลพาธี ในการควบคุมวัชพืช โดยการใช้ผงบดละเอียดจากส่วนใบของต้นขันทองพยาบาท หรือเรียกว่ายายปลวก (*Suregada multiflorum* (A. Juss) Baill.) นำมาปั้นทำให้เป็นรูปเม็ด (granule) โดยมีส่วนผสม 50% ผงบดละเอียดของ *S. multiflorum* + 25% น้ำแป้งมันสำปะหลัง และ 25% แคลเซียมคาร์บอเนต สามารถยับยั้งการงอก ความยาวส่วนลำต้นเหนือดิน และความยาวส่วนรากของพืชทดสอบผักโขม และหญ้าข้าวนก ได้อย่างชัดเจน (Laosinwattana *et al.*, 2010) นอกจากนี้ การใช้สารสกัดจากส่วนลำต้นเหนือดินของทานตะวันและข้าวฟ่างผสมเข้ากับสารป้องกันกำจัดวัชพืช (ได้แก่ Mesosulfuron ร่วมกับ Idosulfuron, Phenoxaprop-*p*-ethyl, Isoproturon และ Metribuzin เป็นต้น) โดยใช้ปริมาณสารป้องกันกำจัดวัชพืชเพียง 1 ใน 4 ตามอัตราแนะนำของสารป้องกันกำจัดวัชพืชในแต่ละชนิด ทำให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืชข้าวโอ๊ทป่า (wild oat) และ *Phalaris canariensis* (canary grass) ได้ดีเทียบเท่ากับการใช้สารป้องกันกำจัดวัชพืช ในแต่ละชนิดเพียงอย่างเดียว ซึ่งสามารถลดปริมาณของการใช้สารป้องกันกำจัดวัชพืชได้มากถึง 75 เปอร์เซ็นต์ (Mushtaq *et al.*, 2010) แสดงให้เห็นว่า หากมีการใช้สารอัลลิโลพาธิคของสารสกัดจากพืชร่วมกับสารป้องกันกำจัดวัชพืช จะสามารถช่วยลดปริมาณการใช้สารป้องกันกำจัดวัชพืชลงได้ และยังช่วยลดโอกาสการเกิดวัชพืชต้านทานสารป้องกันกำจัดวัชพืช (herbaicide-resistant weeds) ได้อีกด้วย (Farooq *et al.*, 2011)

ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการแยกกลุ่มสาร และโครงสร้างทางเคมีของสารอัลลิโลพาธิคนั้น ได้มีการใช้

เทคนิค/วิธีการ และเครื่องมือหลายอย่าง นำมาใช้ในการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารอัลลิโลพาธิค จากการรายงานของ Bertoldi *et al*. (2012) ซึ่งได้รายงานไว้ว่าเมื่อนำสารสกัดจาก *Festuca arundinacea* Shreb. ไปทำการวิเคราะห์หากลุ่มของสารอัลลิโลพาธิคโดยการใช้ LC-MS พบว่า มีสารอัลลิโลพาธิคหลายชนิด ได้แก่ อัลคาลอยด์ และฟลาโวลอยด์ เป็นต้น นอกจากนี้ในการศึกษาของ Mutlu *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาชนิดของสารอัลลิโลพาธิคจากสารสกัดของ *Nepeta meyeri* Benth. โดยการใช้ GC–MS พบว่า มีสาร 4aα, 7α, 7aβ-nepetalactone และสาร 4aα, 7α, 7aα-nepetalactone ที่สามารถยังยั้งการงอกของวัชพืช *Amaranthus retroflexus* L., *Bromus danthoniae* Trin., *Bromus intermedius* Guss. และ *Lactuca serriola* L. ได้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาโครงสร้างทางเคมีของสารอัลลิโลพาธิคที่ชัดเจน สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นสารป้องกันกำจัดวัชพืชต้นแบบจากธรรมชาติ (bio-herbicide template) สำหรับการควบคุมวัชพืชต่อไป

หญ้าโขย่ง (*Rottboellia cochinchinensis* (Lour.) W.D. Clayton) เป็นวัชพืชวงศ์หญ้า จัดเป็นวัชพืชร้ายแรง 1 ใน 18 ชนิดของโลก ที่มีถิ่นกำเนิดในแถบเขตร้อนชื้นและเขตกึ่งร้อน (Alloub *et al*., 2005; Hall and Patterson, 1992; Millhollon and Buner, 1993) พบว่ามีการระบาดของหญ้าโขย่งในพื้นที่ปลูกถั่วเหลือง ข้าวโพด และอ้อย (Lejeune *et al*., 1994; Strahan *et al*., 2000; Lencse and Griffin, 1991) ในประเทศไทยมักพบการแพร่กระจายของหญ้าโขย่งในข้าวโพด อ้อย และสวนไม้ผล ซึ่งมีความสามารถในการแข่งขันสูง และเป็นไปได้ว่าอาจจะมีศักยภาพทางอัลลิโลพาธีในการควบคุมวัชพืช โดยที่ได้มีการรายงานจากเกษตรกรในเขตพื้นที่ อ. แจ้ห่ม จ. ลำปาง ว่ามีการนำหญ้าโขย่งมาใช้ในการควบคุมวัชพืชในแปลงปลูกพืชผัก โดยที่ในช่วงต้นฤดูฝนปล่อยให้หญ้าโขย่งเจริญเติบโต จนกระทั่งออกดอกและติดเมล็ด ต่อมาพอถึงในช่วงปลายฤดูฝน ทำการนาบให้ส่วนของต้นหญ้าโขย่งล้มราบลงปกคลุมบนผิวดิน และใช้หญ้าโขย่งในลักษณะของวัสดุคลุมแปลง ก่อนทำการปลูกพืชผักชนิดต่าง ๆ โดยไม่ต้องทำการไถพรวนดิน ซึ่งส่วนของลำต้นและใบของหญ้าโขย่งที่คลุมผิวดินนั้น สามารถป้องกันไม่ให้เมล็ดหญ้าโขย่ง และเมล็ดวัชพืชชนิดอื่น ๆ เจริญเติบโตได้ ส่งผลทำให้พืชผักชนิดต่าง ๆ สามารถเจริญเติบโตได้ดี และมีวัชพืชขึ้นแข่งขันในระดับที่ต่ำ จนกระทั่งถึงระยะเวลาเก็บเกี่ยว นอกจากนี้ยังได้มีรายงานว่าหญ้าโขย่งมีผลยับยั้งการงอกและการเติบโตของพืชทดสอบ ได้แก่ ข้าว (Casini *et al*., 1998) หัวผักกาด (Kobayashi *et al*., 2008) หญ้าข้าวนก ก้นจ้ำขาวดอกใหญ่ และผักกาดหอม พันธุ์ OP (Meksawat and Pornprom, 2010) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ข้อมูลเกี่ยวกับกิจกรรมทางอัลลิโลพาธีของหญ้าโขย่ง ยังไม่ชัดเจน และยังไม่มีรายงานที่แน่ชัดว่า สารสกัดจากหญ้าโขย่งประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ ที่มีคุณสมบัติเป็นสารอัลลิโลพาธิคชนิดใดบ้าง ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการ 1) ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากหญ้าโขย่งที่มีต่อการเติบโตของพืชทดสอบ และ 2) ศึกษาการแยกกลุ่มสารออกฤทธิ์จากหญ้าโขย่งที่มีผลยับยั้งการเติบโตของพืชทดสอบ โดยเชื่อว่าการศึกษาศักยภาพทางอัลลิโลพาธีของหญ้าโขย่ง จะนำไปสู่การลดหรือทดแทนการใช้สารป้องกันกำจัดวัชพืช ในระบบการปลูกพืช ซึ่งมีความปลอดภัยทางด้านอาหารและสิ่งแวดล้อม (food and environmental safety) เพื่อนำไปใช้ในระบบการทำการเกษตรแบบยั่งยืนต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมหญ้าโขย่ง และพืชทดสอบ

นำต้นหญ้าโขย่งในระยะเริ่มออกดอกที่ขึ้นภายใต้สภาพแปลงปลูกพืชของเกษตรกร ในเขตพื้นที่ อ.แจ้ห่ม จ.ลำปาง มาทำการแยกออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนเหนือดิน (ลำต้นและใบ) และส่วนราก ทำการตัดชิ้นส่วนของหญ้าโขย่งให้มีขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร ก่อนนำมาผึ่งในที่ร่มจนแห้ง (air dried) แล้วจึงบดแต่ละชิ้นส่วนของหญ้าโขย่งให้เป็นผงบดละเอียด (itchgrass powder) เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมไว้ใช้ในแต่ละการทดลองต่อไป

พืชทดสอบที่นำมาใช้มีทั้งหมด 2 ชนิด ได้แก่ สาบแร้งสาบกา (*Ageratum conyzoides* L.) และ

ผักกาดหอม พันธุ์ OP (*Lactuca sativa* L. var. OP) ทำการเพาะเมล็ดพืชทดสอบในกล่องพลาสติก ที่รองด้วยกระดาษเพาะเมล็ด แล้วจึงนำไปไว้ในตู้เพาะเมล็ด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ได้รับแสงจากหลอดไฟฟ้าฟลูออเรสเซนต์นาน 24 ชั่วโมงต่อวัน โดยกำหนดให้ความยาวรากของเมล็ดพืชทดสอบหลังจากงอก (test plant seedling) ไม่เกิน 2 มิลลิเมตร ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การสกัดและผลของสารสกัดหยาบหญ้าโขย่งที่มีต่อการเติบโตของพืชทดสอบ

การสกัดสารสกัดหยาบ (crude extract) จากหญ้าโขย่ง ทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการเคมี สาขาวิชาเคมี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม โดยวิธี maceration นำแต่ละส่วนของหญ้าโขย่ง (ส่วนเหนือดินและส่วนราก) ที่บดละเอียด 1 กิโลกรัม มาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล 5 ลิตร (อัตราส่วน 1 : 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ร่วมกับการใช้อัลตร้าโซนิกส์ช่วยในการสกัด วันละ 1 ชั่วโมง แล้วจึงกรองแยกกากออกโดยวิธีการกรองสุญญากาศ นำสิ่งกรองที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกระทั่งตัวทำละลายระเหยออกหมด ซึ่งจะได้สารสกัดหยาบจากหญ้าโขย่งที่นำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากหญ้าโขย่งที่มีต่อการเติบโตของพืชทดสอบ วางแผนการทดลองแบบ 2×3 factorial in CRD จำนวน 4 ซ้ำ ซึ่งการทดลองได้ประยุกต์ตามวิธีของ Meksawat and Pornprom (2010) โดยนำสารละลายสารสกัดหยาบจากหญ้าโขย่งแต่ละส่วนที่ละลายน้ำ ความเข้มข้น 0, 750 และ 7,500 พีพีเอ็ม ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใส่ในจานแก้วทดสอบที่รองด้วยกระดาษเพาะเมล็ด นำต้นอ่อนของพืชทดสอบแต่ละชนิดวางลงบนจานแก้วทดสอบ จานละ 25 ต้น โดยใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม (control) แล้วนำจานแก้วทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยได้รับแสงจากหลอดไฟฟ้าฟลูออเรสเซนต์ตลอด 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน การบันทึกข้อมูล โดยวัดความยาวส่วนลำต้นเหนือดิน (shoot length) และส่วนราก (root length) ของพืชทดสอบแต่ละชนิด นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ โดยใช้การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรม R version 2.9.1

การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของสารอัลลิโลพาธิคจากหญ้าโขย่ง

นำสารสกัดหยาบหญ้าโขย่งส่วนเหนือดิน มาทำการแยกกลุ่มสารและทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน (Partition) ในตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด 5 ชนิด โดยนำสารสกัดหยาบหญ้าโขย่งชั้นเมทานอล มาละลายใน 50 เปอร์เซนต์ เมทานอลในน้ำ แล้วจึงเริ่มต้นทำการแยกแบบแบ่งส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ในปริมาตรที่เท่ากันกับปริมาตรเริ่มต้นของสารละลาย ทำการแยกแบบแบ่งส่วนทั้งหมด 3 ครั้ง หลังจากนั้นเก็บสารละลายชั้นเฮกเซนรวมกัน แล้วจึงนำสารละลายลายไประเหยตัวทำละลายออก ซึ่งจะได้สารสกัดชั้นเฮกเซน ส่วนสารละลายชั้นน้ำที่เหลือ นำไปทำการแยกแบบแบ่งส่วนต่อด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเตด บิวทานอล และน้ำ ต่อไปตามลำดับ ก็จะได้สารสกัดในชั้นของตัวทำละลายต่างๆ แยกออกมา (ภาพที่ 1) เมื่อนำสารละลายในแต่ละชั้นของตัวทำละลาย ไประเหยตัวทำละลายออกจนแห้งแล้ว จึงนำสารสกัดในแต่ละชั้นของตัวทำละลายไปทดสอบการออกฤทธิ์ต่อการเติบโตของพืชทดสอบต่อไป

นำสารสกัดชั้นน้ำซึ่งมีการออกฤทธิ์ที่ดี ละลายในตัวทำละลายโพรพานอล นำเฉพาะส่วนที่ละลายในโพพานอลมาแยกกลุ่มสาร โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography) โดยใช้คอลัมน์ขนาด 2.5×50 เซนติเมตร บนซิลิกาเจล (siliga gel 60, Merk, Germany) โดยการชะ (elution) ด้วยตัวชะคือ อะซีโตนต่อเมทานอล 19 : 1, 4 : 1 และเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เก็บสารละลายเป็นส่วน ๆ (fractions) นำมาวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) รวมสารละลายส่วนที่มีค่า R_f (rate of flow value) เท่ากัน เป็นกลุ่มเดียวกัน แล้วจึง

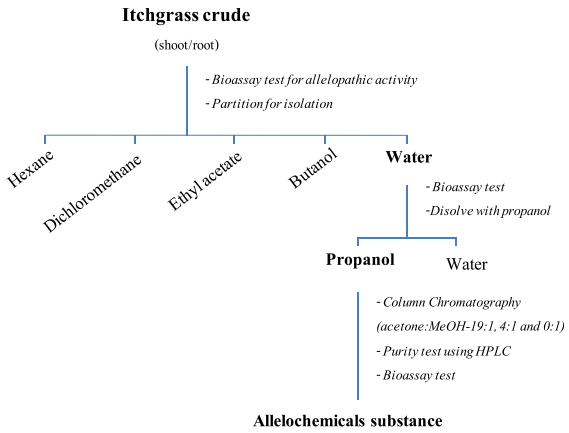
นำไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ โดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) โดยใช้คอลัมน์ RP-C18 (ACE, UK) ขนาด 4.6×250 mm, 5 µm ระบบตัวทำละลายคือ น้ำและเมทานอล แบบ linear gradient (5% น้ำ - 95% เมทานอล) อัตราการไหล (flow rate) 1 มิลลิลิตรต่อนาที ด้วยตัวตรวจวัดแบบโฟโตไดโอดแอเรย์ (Photo diode array detector) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร หลังจากที่ทำการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารสำคัญ จึงนำสารไปทดสอบการออกฤทธิ์ต่อการเติบโตของพืชทดสอบต่อไป

ผลและวิจารณ์

การสกัดและผลของสารสกัดหยาบหญ้าโขย่งที่มีต่อการเติบโตของพืชทดสอบ

ในการสกัดสารสกัดหยาบหญ้าโขย่ง ด้วยตัวทำละลายเมทานอล จะได้สารสกัดหยาบชั้นเมทานอลที่มีลักษณะเป็นของหนืดสีเขียวเข้ม โดยได้ปริมาณสารสกัดหยาบทั้งหมด 25.6435 กรัม เมื่อนำไปศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากหญ้าโขย่งที่มีต่อการเติบโตของพืชทดสอบ พบว่า สารสกัดหยาบจากหญ้าโขย่งมีผลยับยั้งการเติบโตของพืชทดสอบสาบแร้งสาบกา และผักกาดหอม พันธุ์ OP ส่งผลทำให้ความยาวส่วนเหนือดิน และความยาวส่วนรากลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการใช้สารสกัดหยาบหญ้าโขย่งที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น ได้แก่ 7,500 พีพีเอ็ม ส่งผลทำให้การเติบโตของต้นอ่อนพืชทดสอบทั้ง 2 ชนิด ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากหญ้าโขย่งที่ 0 พีพีเอ็ม นอกจากนี้สารสกัดหยาบจากหญ้าโขย่งส่วนเหนือดินมีผลยับยั้งการเติบโตของพืชทดสอบทั้ง 2 ชนิด ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากหญ้าโขย่งส่วนราก (ตารางที่ 1)

จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากหญ้าโขย่งที่มีต่อการเติบโตของพืชทดสอบ จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากหญ้าโขย่งมีผลในการยับยั้งความยาวของลำต้นส่วนเหนือดิน และความยาวส่วนรากของพืชทดสอบ ซึ่งมีความสอดคล้องกับ Kobayashi *et al*. (2008) และ Meksawat and Pornprom (2010) ที่รายงานไว้ว่า หญ้าโขย่งจากแปลงเกษตรกรในเขตพื้นที่ อ. แจ้ห่ม จ. ลำปาง มีการปลดปล่อยสารอัลลิโลพาธิคลงสู่ดิน โดยที่จะไปมีผลยับยั้งการเติบโตของพืชชนิดอื่นที่อยู่ข้างเคียง ทำให้จำนวนประชากรของวัชพืชลดลง เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบให้สูงขึ้น ส่งผลทำให้ยับยั้งการเติบโตของพืชทดสอบเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Kato-Noguchi *et al*. (2010) ที่ได้รายงานว่าสารสกัดหยาบจากส่วนใบและลำต้นของ *Vulpia myuros* มีผลยับยั้งการเติบโตของพืชทดสอบ โดยที่สารจะมีผลยับยั้งการเติบโตเพิ่มขึ้นเมื่อใช้สารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาเกี่ยวกับศักยภาพทางอัลลิโลพาธีในการควบคุมวัชพืช เช่น สารสกัดหยาบจาก Bangladesh rice (*Oryza sativa* L. cv. BR17) สามารถยับยั้งการเติบโตของหญ้าข้าวนก และหญ้านกสีชมพู (Salam *et al*., 2009) เป็นต้น แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบจากหญ้าโขย่งมีศักยภาพทางอัลลิโลพาธี ส่งผลยับยั้งการเติบโตของพืชทดสอบสาบแร้งสาบกา และผักกาดหอม พันธุ์ OP โดยเชื่อว่าหญ้าโขย่งอาจจะมีการผลิตสารอัลลิโลพาธิคในขณะที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตและถูกปลดปล่อยลงสู่ดิน ซึ่งจะไปมีผลยับยั้งการเติบโตของสาบแร้งสาบกา และผักกาดหอม พันธุ์ OP อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานว่า สารอัลลิโลพาธิคจากหญ้าโขย่งเป็นสารชนิดใด ดังนั้นในการศึกษาขั้นตอนต่อไป จึงทำการแยกกลุ่มสารอัลลิโลพาธิคออกจากสารสกัดหยาบ และศึกษาวิธีการทำให้สารอัลลิโลพาธิคจากหญ้าโขย่งบริสุทธิ์ตลอดจนทำการทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารอัลลิโลพาธิคจากหญ้าโขย่ง โดยการทดสอบทางชีววิธีต่อไป



ภาพที่ 1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารอัลลิโลพาธิคจากหญ้าโขย่ง

ตารางที่ 1 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากหญ้าโขย่งต่อการเติบโตของต้นอ่อนพืชทดสอบ

Treatment	*Ageratum conyzoides* L.		*Lactuca sativa* L. var. OP	
	shoot length	root length	shoot length	root length
	cm			
Crude extract:				
Itchgrass shoot	0.28	1.23	0.29 b	2.23
Itchgrass root	0.30	1.27	0.33 a	2.29
F-test	ns[1/]	ns	**	ns
Concentration (ppm):				
0	0.34 a	1.78 a	0.35 a	2.69 a
750	0.35 a	1.75 a	0.36 a	2.70 a
7,500	0.19 b	0.21 b	0.23 b	1.40 b
F-test	**	**	**	**
Crude extract × Concentration	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)	17.14	8.19	10.15	5.33

[1/]Means in the same column followed by the same letters are not significantly different by DMRT. (ns = not-significant and ** = P < 0.01)

การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของสารอัลลิโลพาธิคจากหญ้าโขย่ง

จากการศึกษาการแยกกลุ่มสารอัลลิโลพาธิค จากหญ้าโขย่ง โดยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน (Partition) จะได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 5 ส่วน ได้แก่ สารสกัดหยาบที่ละลายในเฮกเซน (3.0560 กรัม) ไดคลอโรมีเทน (3.4276 กรัม) เอทิลแอซิเตด (1.7182 กรัม) บิวทานอล (3.5505 กรัม) และน้ำ (14.9798 กรัม) ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดหยาบชั้นน้ำ (H_2O-crude) ไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารอัลลิโลพาธิคจากหญ้าโขย่ง โดยการทดสอบทางชีววิธี พบว่า สารสกัดหยาบชั้นน้ำส่งผลยังยั้งการเติบของสาบแร้งสาบกา และผักกาดหอม พันธุ์ OP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติยิ่ง โดยสารสกัดหยาบชั้นน้ำมีการยับยั้งความยาวของส่วนลำต้นเหนือดิน และส่วนรากของพืชทดสอบทั้ง 2 ชนิด โดยที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบชั้นน้ำ พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นให้มากขึ้นส่งผลทำให้มีการยับยั้งการเติบโตของพืชทดสอบ สาบแร้งสาบกา และผักกาดหอม พันธุ์ OP เพิ่มมากขึ้น ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Kobayashi *et al*. (2008) และ Meksawat and Pornprom (2010) ที่ได้รายงานไว้ว่า สารสกัดจากหญ้าโขย่งสามารถยับยั้งการเติบโตของพืชทดสอบ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจะทำให้มีการยับยั้งการเติบโตของพืชทดสอบเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบชั้นน้ำของหญ้าโขย่งประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารอัลลิโลพาธิค

ในการแยกกลุ่มสารออกฤทธิ์ ออกจากสารสกัดหยาบชั้นน้ำ โดยการนำไปละลายด้วยโพรพานอล พบว่าสามารถแยกสารสกัดแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ละลายในโพรพานอล (propanol-fraction) และส่วนที่ละลายในน้ำ (H_2O-fraction) เมื่อนำสารส่วนที่ละลายในโพรพานอลไปทำการแยกกลุ่มสาร โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งชะด้วยตัวทำละลายอะซีโตนต่อเมทานอล อัตราส่วน 19 : 1, 4 : 1 และ 100 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล ตามลำดับ นำสารละลายแต่ละส่วนที่ได้จากการแยกกลุ่มสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ไปวิเคราะห์หาค่า R_f โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) ซึ่งสามารถแยกกลุ่มสารละลายที่มีค่า R_f แตกต่างกันได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม เมื่อทำการพิสูจน์ความบริสุทธิ์ของสารด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่า สารสำคัญมีลักษณะเป็นของแห้งสีเหลืองอ่อน ที่ถูกชะออกด้วยตัวทำละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ มีความบริสุทธิ์มากกว่า 95 เปอร์เซนต์ (ภาพที่ 2) เมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารอัลลิโลพาธิคโดยการทดสอบทางชีววิธี พบว่า สารสำคัญที่ถูกชะออกด้วยตัวทำละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ มีผลยับยั้งการเติบโตของพืชทดสอบสาบแร้งสาบกา และผักกาดหอม พันธุ์ OP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติยิ่ง โดยส่งผลยับยั้งความยาวของส่วนลำต้นเหนือดินและส่วนรากของพืชทดสอบทั้ง 2 ชนิด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อใช้สารสำคัญที่ถูกชะออกด้วยตัวทำละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งก็คือ ส่วนของสารที่ออกฤทธิ์ (inhibitor-fraction) ที่ความเข้มข้น 4,000 พีพีเอ็ม จะส่งผลยับยั้งความยาวของส่วนลำต้นเหนือดิน และส่วนรากของสาบแร้งสาบกา และผักกาดหอม พันธุ์ OP อย่างชัดเจน (ตารางที่ 3 และภาพที่ 3) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบของหญ้าโขย่งประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ที่ส่งผลยับยั้งการเติบโตของพืชทดสอบ โดยจะอยู่ในส่วนที่ถูกชะออกมาด้วยตัวทำละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารอัลลิโลพาธิคที่ได้จากหญ้าโขย่ง

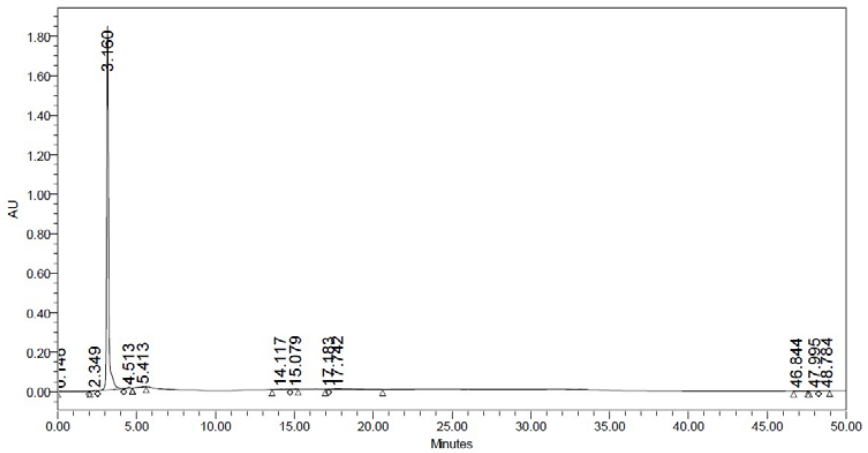
จากการศึกษาผลทางอัลลิโลพาธี ของหญ้าโขย่งจากแปลงของเกษตรกร ในเขตพื้นที่ อ. แจ้ห่ม จ. ลำปาง โดยเชื่อว่า สารจากหญ้าโขย่งที่ปลดปล่อยออกมามีคุณสมบัติเป็นสารอัลลิโลพาธิค ซึ่งสังเกตได้จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบหญ้าโขย่ง ที่มีผลต่อการเติบโตของพืชทดสอบสาบแร้งสาบกา และผักกาดหอม พันธุ์ OP จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากหญ้าโขย่งมีผลในการยับยั้งความยาวของลำต้นส่วนเหนือดิน และความยาวส่วนรากของพืชทดสอบ เมื่อทำการแยกกลุ่มสารและทำสารอัลลิโลพาธิคจากหญ้าโขย่งให้บริสุทธิ์ พบว่า การใช้เทคนิคการแยกกลุ่มสารแบบแบ่งส่วนร่วมกับการใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี สามารถแยกสารอัลลิพาธิคจากสารสกัดหยาบหญ้าโขย่งให้บริสุทธิ์ได้ ซึ่งการใช้หลักการของโครมาโทกราฟี (chromatography) เช่น คอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (thin-layer

chromatography) และโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) สามารถทำการแยกสารอัลลิโลพาธิคจากพืชได้ (Dinan *et al.*, 2001) นอกจากนี้การใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีสามารถแยกสารอัลลิโลพาธิค เช่น การแยกสาร abscisic acid-b-D-glucopyranosyl ester (ABA-GE) จากสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของ *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. (Kato-Noguchi *et al.*, 2011) ดังนั้นในการศึกษาขั้นตอนต่อไปควรมีการพิจารณาเกี่ยวกับทำการศึกษาโครงสร้างทางเคมี (structural elucidation) ของสารอัลลิโลพาธิคจากหญ้าโขย่ง โดยทำการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารอัลลิโลพาธิค ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปี (spectroscopy technique) เพื่อให้ทราบถึงชนิดของสารอัลลิโลธิคจากหญ้าโขย่งที่ชัดเจน และสามารถนำสารอัลลิโลพาธิคจากหญ้าโขย่ง ไปใช้ในการพัฒนาเป็นสารป้องกันกำจัดวัชพืชต้นแบบจากธรรมชาติ (bio-herbicide template) ซึ่งจะนำไปสู่การลดหรือทดแทนการใช้สารป้องกันกำจัดวัชพืช ส่งผลทำให้มีความปลอดภัยทางด้านอาหารและสิ่งแวดล้อม (food and environment safety) ตลอดจนมีความปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตมากยิ่งขึ้นในระบบการปลูกพืชแบบยั่งยืนต่อไป

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดหยาบชั้นน้ำ (H_2O-crude) ต่อการเติบโตของพืชทดสอบ

Treatment	*Ageratum conyzoides* L.		*Lactuca sativa* L. var. OP	
	shoot length	root length	shoot length	root length
	cm			
Concentration (ppm):				
0	0.35 a[1/]	1.46 a	0.51 a	3.53 a
400	0.19 b	1.03 b	0.36 b	2.32 b
4,000	0.13 b	0.49 c	0.33 b	0.89 c
F-test	**	**	**	**
C.V. (%)	17.69	5.52	6.85	2.54

[1/]Means in the same column followed by the same letters are not significantly different by DMRT.
(** = P < 0.01)

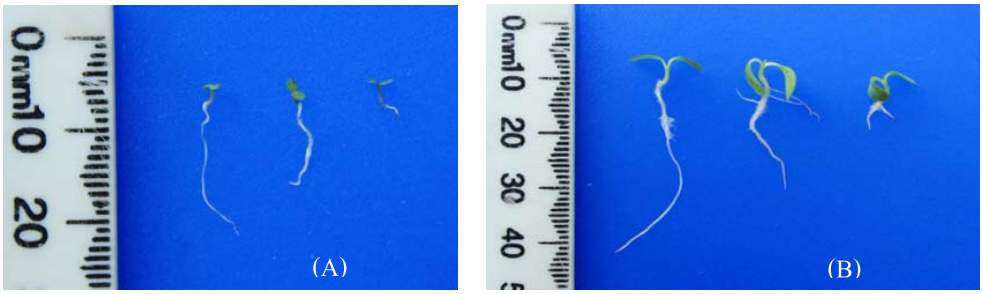


ภาพที่ 2 การทดสอบความบริสุทธิ์ของสารออกฤทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC

ตารางที่ 3 ผลทางอัลลิโลพาธิคของสารออกฤทธิ์ต่อการเติบโตของต้นอ่อนพืชทดสอบ

Treatment	*Ageratum conyzoides* L.		*Lactuca sativa* L. var. OP	
	shoot length	root length	shoot length	root length
	cm			
Concentration (ppm):				
0	0.26 a[1/]	1.47 a	0.50 a	3.48 a
400	0.15 b	0.76 b	0.34 b	1.51 b
4,000	0.12 b	0.15 c	0.28 b	0.53 c
F-test	**	**	**	**
C.V. (%)	8.25	3.94	13.97	6.41

[1/]Means in the same column followed by the same letters are not significantly different by DMRT. (** = P < 0.01)



ภาพที่ 3 ลักษณะอาการของต้นอ่อนสาบแร้งสาบกา (A) และต้นอ่อนผักกาดหอม พันธุ์ OP (B) หลังได้รับสารออกฤทธิ์ ที่ระดับความเข้มข้น 0 400 และ 4,000 พีพีเอ็ม ตามลำดับ

สรุป

สารสกัดหยาบหญ้าโขย่งมีผลต่อการเติบโต ของต้นอ่อนสาบแร้งสาบกา และผักกาดหอม พันธุ์ OP โดยส่งผลในการยับยั้งความยาวของลำต้นส่วนเหนือดิน และความยาวส่วนรากของพืชทดสอบ เมื่อทำการแยกกลุ่มสารอัลลิโลพาธิคจากหญ้าโขย่งและทำให้บริสุทธิ์ พบว่า การใช้วิธีการแยกแบบแบ่งส่วนร่วมกับคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยการชะด้วยตัวทำละลายในอัตราส่วนระหว่างอะซีโตนต่อเมทานอล 19 : 1, 4 : 1 และ 100 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล ตามลำดับ สามารถทำการแยกสารสำคัญจากสารสกัดหยาบหญ้าโขย่งให้บริสุทธิ์ได้ เมื่อนำไปทดสอบทางชีววิธี พบว่า สารสำคัญที่แยกได้จากสารสกัดหยาบหญ้าโขย่งสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของต้นอ่อนสาบแร้งสาบกา และผักกาดหอม พันธุ์ OP แสดงให้เห็นว่า สารสำคัญที่แยกได้จากสารสกัดหยาบหญ้าโขย่ง มีคุณสมบัติเป็นสารอัลลิโลพาธิค ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเติบโตของพืชทดสอบ

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.) สัญญาเลขที่ PHD/0023/2552 สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

Alloub, H., A. S. Juraimi, A. Rajan, J. Kadir, M. S. Saad and S. Sastroutomo. 2005. Growth behavior of itchgrass (*Rottboellia cochinchinensis*) in Peninsular Malaysia. **Weed Biology and Management**. 5: 8-13.

Bertoldi, C. D., M. D. Leo, L. Ercoli and A. Braca. 2012. Chemical profile of Festuca arundinacea extract showing allelochemical activity. **Chemoecology**. 22: 13-21.

Casini, P., V. Vecchio and I. Tamantini. 1998. Allelopathic interference of itchgrass and cogongrass germination and early development of rice. **Tropical Agriculture**. 75: 445-451.

Dinan, L., J. Harmatha and R. Lafont. 2001. Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. **Journal of Chromatography A**. 935: 105–123.

Farooq, M., K. Jabran, A. Z. Cheema, A. Wahid and K. H. M. Siddique. 2011. The role of allelopathy in agricultural pest management. **Pest Management Science**. 67: 493-506.

Hall, D. W. and D. T. Patterson. 1992. Itchgrass-stop the trains?. **Weed Technology**. 6: 239-241.

Kato-Noguchi, H., M. Yamamoto, K. Tamura, T. Teruya, K. Suenaga and Y. Fujii. 2010. Isolation and identification of potent allelopathic substances in rattail fescue. **Plant Growth Regulation**. 60: 127-131.

Kato-Noguchi, H., Y. Fushimi, Y. Tanaka, T. Teruya and K. Suenaga. 2011. Allelopathy of red pine: isolation and identification of an allelopathic substance in red pine needles. **Plant Growth Regulation**. 65: 299-304.

Kobayashi, K., D. Itaya, P. Mahatamnuchoke and T. Pornprom. 2008. Allelopathic potential of itchgrass (*Rottboellia exaltata* L. f.) powder incorporated into soil. **Weed Biology and Management**. 8: 64-68.

Laosinwattana, C., C. Boonleom, M. Teerarak, S. Thitavasanta and P. Charoenying. 2010. Potential allelopathic effects of *Suregada multiflorum* and the influence of soil type on its residue's efficacy. **Weed Biology and Management**. 10(3): 153-159.

Lejeune, K. R., J. L. Griffin, D. B. Reynolds and A. M. Saxton. 1994. Itchgrass (*Rottboellia cochinchinensis*) interference in soybean (*Glycine max*). **Weed Technology**. 8: 733-737.

Lencse, R. J. and J.L. Griffin. 1991. Itchgrass (*Rottboellia cochinchinensis*) interference in sugarcane (*Saccharum* sp.). **Weed Technology**. 5: 396-399.

Meksawat, S. and T. Pornprom. 2010. Allelopathic effect of itchgrass (*Rottboellia cochinchinensis* (Lour.) W.D. Clayton) on seed germination and plant growth. **Weed Biology and Management**. 10: 16-24.

Millhollon, R. W. and D. M. Burner. 1993. Itchgrass (*Rottboellia exaltata*) biotypes in world populations. **Weed Science**. 41: 379-387.

Mushtaq, M. N., Z. A. Cheema, A. Khaliq and M. R. Naveed. 2010. A 75% reduction in herbicide use through integration with sorghum + sunflower extracts for weed management in wheat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 90: 1897-1904.

Mutlu, S., O. Atici, N. Esim and E. Mete. 2011. Essential oils of catmint (*Nepeta meyeri* Benth.) induce oxidative stress in early seedlings of various weed species. **Acta Physiologiae Plantarum**. 33: 943-951.

Office of Agricultural Regulation. 2012. Department of Agriculture. Available source: http://www.doa.go.th/ard, April 18, 2013.

Salam, M.D., M. Morokuma, T. Teruya, K. Suenaga and H. Kato-Noguchi. 2009. Isolation and identification of a potent allelopathic substance in Bangladesh rice. **Plant Growth Regulation**. 58: 137-140.

Scognamiglio, M., B. D'Abrosca, A. Esposito, S. Pacifico, P. Monaco and A. Fiorentino. 2013. Plant growth inhibitors: allelopathic role or phytotoxic effects? Focus on Mediterranean biomes. **Phytochemistry Reviews.**

Strahan, R. E., J. L. Griffin, D. B. Reynolds and D. K. Miller. 2000. Interference between *Rottboellia cochinchinensis* and *Zea mays*. **Weed Science**. 48: 205-211.